

VERIFICATION OF A TRANSLATION  
(VERIFICATION D'UNE TRADUCTION)

10971 U.S. PRO  
09/918485  
08/01/01

I, the below named translator, hereby declare that :

My name and post office address are as stated below :

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified international application was filed, and that I believe the English translation of the international application n° PCT/FR 8800292 is a true and complete translation of the above identified international application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true ; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such wilful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Date December 4, 1989

Full name of the translator ..... JARVIS ..... DERA .....  
(Nom et prénom du traducteur)

Signature of the translator ..... Dent Jarvis .....  
(Signature du traducteur)

Post Office Address (Adresse postale) ... 7 rue d'URSEL ...  
... 67000 STRASBOURG ...

RECEIVED

filed  
12/11/89

6/5/95

SEQUENCES DE NUCLEOTIDES CODANT POUR DES POLYPEPTIDES  
DOTES D'UNE ACTIVITE LARVICIDE VIS-A-VIS DE LEPIDOPTERE

-----

U.S. PTO  
09/918485



5 L'invention a pour objet des séquences de nucléotides codant pour des polypeptides dotés d'une activité larvicide vis-à-vis de lépidoptères.

10 Elle vise plus spécialement des moyens, en particulier des séquences nucléotidiques, des polypeptides ou encore des vecteurs, ou des souches bactériennes, modifiés par ces séquences et exprimant des polypeptides permettant de préparer des compositions larvicides actives vis-à-vis de lépidoptères, de préférence vis-à-vis de Spodoptera littoralis (ci-après S. littoralis) ou Mamestra brassicae (ci-après désignée par M. brassicae) ou capables de transformer les plantes à

15 traiter en leur conférant ce type d'activité.

On sait que la plupart des isolats de B. thuringiensis présentent une activité toxique à l'égard de larves de plus de cent espèces de lépidoptères.

20 Cette activité résulte, de la capacité des souches de B. thuringiensis à synthétiser, au moment de la sporulation, des inclusions cristallines de nature protéique, ou  $\delta$ -endotoxines, sous le contrôle d'un ou plusieurs types de gènes.

25 On a montré que l'activité de ces polypeptides est contenue dans la moitié  $\text{NH}_2$ -terminale ou N-terminale de la protéine.

30 Les travaux réalisés ont montré la spécificité élevée des  $\delta$ -endotoxines vis-à-vis de larves d'une espèce donnée.

En raison de cette spécificité élevée, de nombreuses espèces de lépidoptères, notamment de la famille des Noctuelles, ne réagissent que faiblement aux préparations commerciales de B. thuringiensis disponibles.

35 Il en est ainsi en particulier de l'espèce

decd  
12/1/85

S.littoralis, insecte polyphage qui constitue le principal parasite du coton et d'autres cultures industriellement importantes. Parmi ces cultures, on citera le maïs, le ricin, le tabac, l'arachide, des plantes fourragères, telles que le trèfle ou la luzerne, ou encore des produits maraîchers comme le chou ou la tomate.

On conçoit donc l'intérêt de disposer de moyens ciblant spécifiquement et efficacement la famille des Noctuelles et notamment S.littoralis ou M.brassicae.

Les gènes de  $\delta$ -endotoxines identifiés à ce jour, ne codent pas pour un polypeptide actif préférentiellement à l'égard de S.littoralis.

La recherche par les inventeurs d'une séquence de nucléotides codant pour un polypeptide actif de préférence vis-à-vis des Noctuelles, plus spécialement vis-à-vis de S.littoralis, les a conduits à étudier les isolats naturels de deux souches de B.thuringiensis dont l'activité larvicide sur S.littoralis apparaît plus élevée que celle des préparations industrielles faites à partir d'autres souches de B.thuringiensis.

Il s'agit des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01.

L'étude de ces isolats a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs gènes de  $\delta$ -endotoxines de structures différentes et de spécificités différentes, dont deux gènes préférentiellement actifs contre P.brassicae mais peu actifs vis-à-vis de la Noctuelle du coton et un gène inactif vis-à-vis de P.brassicae et de S.littoralis.

En étudiant l'ADN total de ces isolats et en effectuant des hybridations appropriées, suivies du clonage des fragments identifiés par hybridation, les inventeurs ont constaté qu'il est possible d'isoler des séquences nucléotidiques impliquées dans des gènes de  $\delta$ -endotoxines codant pour des polypeptides actifs, de

préférence contre S. littoralis.

L'invention a donc pour but de fournir des séquences nucléotidiques capables de coder pour au moins la partie NH<sub>2</sub>-terminale d'une  $\delta$ -endotoxine toxique contre les Noctuelles, de préférence contre S. littoralis ou M. brassicae.

Elle a également pour but de fournir un polypeptide toxique à l'égard des Noctuelles.

L'invention vise en outre un procédé d'obtention d'une telle séquence et d'un polypeptide présentant l'activité recherchée ainsi que les moyens intermédiaires tels que vecteurs et souches bactériennes utilisables pour l'obtention du polypeptide.

L'invention vise de plus les applications de ces séquences et polypeptides pour l'élaboration de compositions larvicides à l'égard des Noctuelles, en particulier de S. littoralis et pour la transformation des plantes susceptibles d'être infectées par ces larves.

L'invention concerne une séquence de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de façon spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S. littoralis, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de S. littoralis.

Selon un autre aspect de l'invention, la séquence nucléotidique est caractérisée en ce qu'elle est portée par une séquence de nucléotides d'environ 3kb telle qu'obtenue par recombinaison génétique in vitro de séquences de nucléotides de B. thuringiensis capables de s'hybrider avec des sondes 1, 2 et 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2. Le fragment de 3kb correspond plus spécialement au fragment de restriction HindIII-PstI.

Les séquences de nucléotides de l'invention

sont, en outre, caractérisées en ce qu'elles comportent des sites dans l'ordre suivant : HindIII - HincII - BglII KpnI - HindIII - PstI.

De manière préférée, ces séquences de nucléotides sont obtenues par recombinaison génétique in vitro de séquences d'ADN provenant d'au moins une souche de B.thuringiensis. Dans une variante de réalisation de l'invention, deux souches différentes de B.thuringiensis sont mises en oeuvre.

Des souches de B.thuringiensis particulièrement appropriées pour l'obtention de ces séquences de nucléotides sont les souches correspondant à aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, déposées le 21 Avril 1987 respectivement sous les n° 1-661 et n° I-660 à la Collection nationale de Culture de Microorganismes (C.N.C.M.) à Paris.

D'une manière avantageuse, les séquences de nucléotides de l'invention codent pour un polypeptide capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides présentant l'activité larvicide à l'égard de S.littoralis.

Une séquence de nucléotides selon l'invention est caractérisée en ce qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant :

30

35

GTC TAC<sup>52</sup> TTG ACA GGG GTA GCA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA  
 TAT GGG GCA TAT ATT GAT ATT TTA<sup>112</sup> TAA AAT TTG TTA CGT TTT<sup>172</sup>  
 TTG TAT TTT TTC ATA AGA TGT GTC ATA TGT ATT AAA TCG TGG  
 TAA TGA AAA ACA GTA TCA<sup>232</sup> AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA  
 ATA AAA AAA CGG AGG TAT TTT ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT  
 CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT CCT<sup>292</sup> GAA GAA GTA  
 CTT TTG GAT GGA<sup>352</sup> GAA CGG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT  
 GAT ATT TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT  
 GTA CCA GGG GGA GGA TTT TTA GTT GCA TTA<sup>412</sup> ATA GAT TTT GTA  
 TGG GGA ATA GTT GGC CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA GTA  
 CAA<sup>472</sup> ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT  
 AGG AAT GCT GCT ATT GCT AAT TTA<sup>532</sup> GAA GGA TTA GGA AAC AAT  
 TTC AAT ATA TAT GTG GAA GCA TTT AAA GAA TGG GAA GAA<sup>592</sup> GAT  
 CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CGC TTT  
 CGT ATA CTT GAT GGG CTA<sup>652</sup> CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT  
 CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA TCC<sup>712</sup> GTT TAT GCT  
 CAA GCG GCC AAT<sup>772</sup> CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA  
 ATT TTT GGA GAA AGA TGG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT  
 GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT AGG CAT ATT<sup>832</sup> GAT GAA TAT GCT  
 GAT CAC TGT GCA AAT ACG TAT AAT CGG GGA TTA AAT AAT TTA  
 CCG<sup>892</sup> AAA TCT ACG TAT CAA GAT TGG ATA ACA TAT AAT CGA TTA  
 CGG AGA GAC TTA ACA TTG ACT GTA<sup>952</sup> TTA GAT ATC GCC GCT TTC  
 TTT CCA AAC TAT GAC

Des séquences de nucléotides codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, sont caractérisées en ce qu'elles comprennent l'enchaînement (I) défini ci-dessus.

D'une manière avantageuse, la séquence de nucléotides caractérisée par l'enchaînement défini ci-dessus code pour une partie d'un polypeptide ayant une activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis plus élevée que celle des polypeptides codés par des isolats naturels actuellement connus pour leurs effets vis-à-vis de S.littoralis.

L'étude de cette séquence de nucléotides montre qu'elle est caractérisée par un codon d'initiation ATG situé en position 241 à partir duquel une phase ouverte de lecture de 750 nucléotides a été identifiée.

Cette séquence est également caractérisée par un site d'attachement des ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

Selon un autre aspect, la séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée en ce qu'elle comporte, en amont du codon ATG, une séquence allant du nucléotide en position 137 au nucléotide en position 177, fortement homologue à la région trouvée par Wong et al. (1983) et décrit dans (16) en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) et dont les auteurs ont montré qu'elle contenait trois promoteurs BtI, BtII et Ec qui sont respectivement fonctionnels chez B.thuringiensis et E.coli. L'homologie de ces séquences est d'environ 70%.

L'invention concerne également une séquence de nucléotides codant pour la séquence (II) d'acides aminés suivante :

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN  
GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL  
LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE  
ASP ILE SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE  
VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP  
GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN  
ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG  
ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE  
ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU GLU ASP PRO  
ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP PRG PHE ARG  
ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG  
ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR ALA GLN  
ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE  
PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU  
ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP  
HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO  
LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG  
ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE  
PRO ASN TYR ASP



Une meilleure identification de la séquence de nucléotides isolée des souches ci-dessus, déposées à la CNCM a permis de constater que le nucléotide situé en position 273 est la guanine (G), l'acide aminé résultant du codon GTA étant alors la valine.

Or, la lecture du nucléotide correspondant à cette position 273 dans la demande FR.8708090 du 10 juin 1987 avait conduit à mentionner la thymine (T) et, comme acide aminé résultant du codon TTA, la leucine.

Une autre séquence de nucléotides de l'invention est caractérisée par sa capacité d'hybridation avec une sonde formée à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement suivant :

15

20

25

30

35

1  
 2  
 3  
 4  
 5  
 6  
 7  
 8  
 9  
 10  
 11  
 12  
 13  
 14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26  
 27  
 28  
 29  
 30  
 31  
 32  
 33  
 34  
 35  
 36  
 37  
 38  
 39  
 40  
 41  
 42  
 43  
 44  
 45  
 46  
 47  
 48  
 49  
 50  
 51  
 52  
 53  
 54  
 55  
 56  
 57  
 58  
 59  
 60  
 61  
 62  
 63  
 64  
 65  
 66  
 67  
 68  
 69  
 70  
 71  
 72  
 73  
 74  
 75  
 76  
 77  
 78  
 79  
 80  
 81  
 82  
 83  
 84  
 85  
 86  
 87  
 88  
 89  
 90  
 91  
 92  
 93  
 94  
 95  
 96  
 97  
 98  
 99  
 100  
 101  
 102  
 103  
 104  
 105  
 106  
 107  
 108  
 109  
 110  
 111  
 112  
 113  
 114  
 115  
 116  
 117  
 118  
 119  
 120  
 121  
 122  
 123  
 124  
 125  
 126  
 127  
 128  
 129  
 130  
 131  
 132  
 133  
 134  
 135  
 136  
 137  
 138  
 139  
 140  
 141  
 142  
 143  
 144  
 145  
 146  
 147  
 148  
 149  
 150  
 151  
 152  
 153  
 154  
 155  
 156  
 157  
 158  
 159  
 160  
 161  
 162  
 163  
 164  
 165  
 166  
 167  
 168  
 169  
 170  
 171  
 172  
 173  
 174  
 175  
 176  
 177  
 178  
 179  
 180  
 181  
 182  
 183  
 184  
 185  
 186  
 187  
 188  
 189  
 190  
 191  
 192  
 193  
 194  
 195  
 196  
 197  
 198  
 199  
 200  
 201  
 202  
 203  
 204  
 205  
 206  
 207  
 208  
 209  
 210  
 211  
 212  
 213  
 214  
 215  
 216  
 217  
 218  
 219  
 220  
 221  
 222  
 223  
 224  
 225  
 226  
 227  
 228  
 229  
 230  
 231  
 232  
 233  
 234  
 235  
 236  
 237  
 238  
 239  
 240  
 241  
 242  
 243  
 244  
 245  
 246  
 247  
 248  
 249  
 250  
 251  
 252  
 253  
 254  
 255  
 256  
 257  
 258  
 259  
 260  
 261  
 262  
 263  
 264  
 265  
 266  
 267  
 268  
 269  
 270  
 271  
 272  
 273  
 274  
 275  
 276  
 277  
 278  
 279  
 280  
 281  
 282  
 283  
 284  
 285  
 286  
 287  
 288  
 289  
 290  
 291  
 292  
 293  
 294  
 295  
 296  
 297  
 298  
 299  
 300  
 301  
 302  
 303  
 304  
 305  
 306  
 307  
 308  
 309  
 310  
 311  
 312  
 313  
 314  
 315  
 316  
 317  
 318  
 319  
 320  
 321  
 322  
 323  
 324  
 325  
 326  
 327  
 328  
 329  
 330  
 331  
 332  
 333  
 334  
 335  
 336  
 337  
 338  
 339  
 340  
 341  
 342  
 343  
 344  
 345  
 346  
 347  
 348  
 349  
 350  
 351  
 352  
 353  
 354  
 355  
 356  
 357  
 358  
 359  
 360  
 361  
 362  
 363  
 364  
 365  
 366  
 367  
 368  
 369  
 370  
 371  
 372  
 373  
 374  
 375  
 376  
 377  
 378  
 379  
 380  
 381  
 382  
 383  
 384  
 385  
 386  
 387  
 388  
 389  
 390  
 391  
 392  
 393  
 394  
 395  
 396  
 397  
 398  
 399  
 400  
 401  
 402  
 403  
 404  
 405  
 406  
 407  
 408  
 409  
 410  
 411  
 412  
 413  
 414  
 415  
 416  
 417  
 418  
 419  
 420  
 421  
 422  
 423  
 424  
 425  
 426  
 427  
 428  
 429  
 430  
 431  
 432  
 433  
 434  
 435  
 436  
 437  
 438  
 439  
 440  
 441  
 442  
 443  
 444  
 445  
 446  
 447  
 448  
 449  
 450  
 451  
 452  
 453  
 454  
 455  
 456  
 457  
 458  
 459  
 460  
 461  
 462  
 463  
 464  
 465  
 466  
 467  
 468  
 469  
 470  
 471  
 472  
 473  
 474  
 475  
 476  
 477  
 478  
 479  
 480  
 481  
 482  
 483  
 484  
 485  
 486  
 487  
 488  
 489  
 490  
 491  
 492  
 493  
 494  
 495  
 496  
 497  
 498  
 499  
 500  
 501  
 502  
 503  
 504  
 505  
 506  
 507  
 508  
 509  
 510  
 511  
 512  
 513  
 514  
 515  
 516  
 517  
 518  
 519  
 520  
 521  
 522  
 523  
 524  
 525  
 526  
 527  
 528  
 529  
 530  
 531  
 532  
 533  
 534  
 535  
 536  
 537  
 538  
 539  
 540  
 541  
 542  
 543  
 544  
 545  
 546  
 547  
 548  
 549  
 550  
 551  
 552  
 553  
 554  
 555  
 556  
 557  
 558  
 559  
 560  
 561  
 562  
 563  
 564  
 565  
 566  
 567  
 568  
 569  
 570  
 571  
 572  
 573  
 574  
 575  
 576  
 577  
 578  
 579  
 580  
 581  
 582  
 583  
 584  
 585  
 586  
 587  
 588  
 589  
 590  
 591  
 592  
 593  
 594  
 595  
 596  
 597  
 598  
 599  
 600  
 601  
 602  
 603  
 604  
 605  
 606  
 607  
 608  
 609  
 610  
 611  
 612  
 613  
 614  
 615  
 616  
 617  
 618  
 619  
 620  
 621  
 622  
 623  
 624  
 625  
 626  
 627  
 628  
 629  
 630  
 631  
 632  
 633  
 634  
 635  
 636  
 637  
 638  
 639  
 640  
 641  
 642  
 643  
 644  
 645  
 646  
 647  
 648  
 649  
 650  
 651  
 652  
 653  
 654  
 655  
 656  
 657  
 658  
 659  
 660  
 661  
 662  
 663  
 664  
 665  
 666  
 667  
 668  
 669  
 670  
 671  
 672  
 673  
 674  
 675  
 676  
 677  
 678  
 679  
 680  
 681  
 682  
 683  
 684  
 685  
 686  
 687  
 688  
 689  
 690  
 691  
 692  
 693  
 694  
 695  
 696  
 697  
 698  
 699  
 700  
 701  
 702  
 703  
 704  
 705  
 706  
 707  
 708  
 709  
 710  
 711  
 712  
 713  
 714  
 715  
 716  
 717  
 718  
 719  
 720  
 721  
 722  
 723  
 724  
 725  
 726  
 727  
 728  
 729  
 730  
 731  
 732  
 733  
 734  
 735  
 736  
 737  
 738  
 739  
 740  
 741  
 742  
 743  
 744  
 745  
 746  
 747  
 748  
 749  
 750  
 751  
 752  
 753  
 754  
 755  
 756  
 757  
 758  
 759  
 760  
 761  
 762  
 763  
 764  
 765  
 766  
 767  
 768  
 769  
 770  
 771  
 772  
 773  
 774  
 775  
 776  
 777  
 778  
 779  
 780  
 781  
 782  
 783  
 784  
 785  
 786  
 787  
 788  
 789  
 790  
 791  
 792  
 793  
 794  
 795  
 796  
 797  
 798  
 799  
 800  
 801  
 802  
 803  
 804  
 805  
 806  
 807  
 808  
 809  
 810  
 811  
 812  
 813  
 814  
 815  
 816  
 817  
 818  
 819  
 820  
 821  
 822  
 823  
 824  
 825  
 826  
 827  
 828  
 829  
 830  
 831  
 832  
 833  
 834  
 835  
 836  
 837  
 838  
 839  
 840  
 841  
 842  
 843  
 844  
 845  
 846  
 847  
 848  
 849  
 850  
 851  
 852  
 853  
 854  
 855  
 856  
 857  
 858  
 859  
 860  
 861  
 862  
 863  
 864  
 865  
 866  
 867  
 868  
 869  
 870  
 871  
 872  
 873  
 874  
 875  
 876  
 877  
 878  
 879  
 880  
 881  
 882  
 883  
 884  
 885  
 886  
 887  
 888  
 889  
 890  
 891  
 892  
 893  
 894  
 895  
 896  
 897  
 898  
 899  
 900  
 901  
 902  
 903  
 904  
 905  
 906  
 907  
 908  
 909  
 910  
 911  
 912  
 913  
 914  
 915  
 916  
 917  
 918  
 919  
 920  
 921  
 922  
 923  
 924  
 925  
 926  
 927  
 928  
 929  
 930  
 931  
 932  
 933  
 934  
 935  
 936  
 937  
 938  
 939  
 940  
 941  
 942  
 943  
 944  
 945  
 946  
 947  
 948  
 949  
 950  
 951  
 952  
 953  
 954  
 955  
 956  
 957  
 958  
 959  
 960  
 961  
 962  
 963  
 964  
 965  
 966  
 967  
 968  
 969  
 970  
 971  
 972  
 973  
 974  
 975  
 976  
 977  
 978  
 979  
 980  
 981  
 982  
 983  
 984  
 985  
 986  
 987  
 988  
 989  
 990  
 991  
 992  
 993  
 994  
 995  
 996  
 997  
 998  
 999  
 1000  
 1001  
 1002  
 1003  
 1004  
 1005  
 1006  
 1007  
 1008  
 1009  
 1010  
 1011  
 1012  
 1013  
 1014  
 1015  
 1016  
 1017  
 1018  
 1019  
 1020  
 1021  
 1022  
 1023  
 1024  
 1025  
 1026  
 1027  
 1028  
 1029  
 1030  
 1031  
 1032  
 1033  
 1034  
 1035  
 1036  
 1037  
 1038  
 1039  
 1040  
 1041  
 1042  
 1043  
 1044  
 1045  
 1046  
 1047  
 1048  
 1049  
 1050  
 1051  
 1052  
 1053  
 1054  
 1055  
 1056  
 1057  
 1058  
 1059  
 1060  
 1061  
 1062  
 1063  
 1064  
 1065  
 1066  
 1067  
 1068  
 1069  
 1070  
 1071  
 1072  
 1073  
 1074  
 1075  
 1076  
 1077  
 1078  
 1079  
 1080  
 1081  
 1082  
 1083  
 1084  
 1085  
 1086  
 1087  
 1088  
 1089  
 1090  
 1091  
 1092  
 1093  
 1094  
 1095  
 1096  
 1097  
 1098  
 1099  
 1100  
 1101  
 1102  
 1103  
 1104  
 1105  
 1106  
 1107  
 1108  
 1109  
 1110  
 1111  
 1112  
 1113  
 1114  
 1115  
 1116  
 1117  
 1118  
 1119  
 1120  
 1121  
 1122  
 1123  
 1124  
 1125  
 1126  
 1127  
 1128  
 1129  
 1130  
 1131  
 1132  
 1133  
 1134  
 1135  
 1136  
 1137  
 1138  
 1139  
 1140  
 1141  
 1142  
 1143  
 1144  
 1145  
 1146  
 1147  
 1148  
 1149  
 1150  
 1151  
 1152  
 1153  
 1154  
 1155  
 1156  
 1157  
 1158  
 1159  
 1160  
 1161  
 1162  
 1163  
 1164  
 1165  
 1166  
 1167  
 1168  
 1169  
 1170  
 1171  
 1172  
 1173  
 1174  
 1175  
 1176  
 1177  
 1178  
 1179  
 1180  
 1181  
 1182  
 1183  
 1184  
 1185  
 1186  
 1187  
 1188  
 1189  
 1190  
 1191  
 1192  
 1193  
 1194  
 1195  
 1196  
 1197  
 1198  
 1199  
 1200  
 1201  
 1202  
 1203  
 1204  
 1205  
 1206  
 1207  
 1208  
 1209  
 1210  
 1211  
 1212  
 1213  
 1214  
 1215  
 1216  
 1217  
 1218  
 1219  
 1220  
 1221  
 1222  
 1223  
 1224  
 1225  
 1226  
 1227  
 1228  
 1229  
 1230  
 1231  
 1232  
 1233  
 1234  
 1235  
 1236  
 1237  
 1238  
 1239  
 1240  
 1241  
 1242  
 1243  
 1244  
 1245  
 1246  
 1247  
 1248  
 1249  
 1250  
 1251  
 1252  
 1253  
 1254  
 1255  
 1256  
 1257  
 1258  
 1259  
 1260  
 1261  
 1262  
 1263  
 1264  
 1265  
 1266  
 1267  
 1268  
 1269  
 1270  
 1271  
 1272  
 1273  
 1274  
 1275  
 1276  
 1277  
 1278  
 1279  
 1280  
 1281  
 1282  
 1283  
 1284  
 1285  
 1286  
 1287  
 1288  
 1289  
 1290  
 1291  
 1292  
 1293  
 1294  
 1295  
 1296  
 1297  
 1298  
 1299  
 1300  
 1301  
 1302  
 1303  
 1304  
 1305  
 1306  
 1307  
 1308  
 1309  
 1310  
 1311  
 1312  
 1313  
 1314  
 1315  
 1316  
 1317  
 1318  
 1319  
 1320  
 1321  
 1322  
 1323  
 1324  
 1325  
 1326  
 1327  
 1328  
 1329  
 1330  
 1331  
 1332  
 1333  
 1334  
 1335  
 1336  
 1337  
 1338  
 1339  
 1340  
 1341  
 1342  
 1343  
 1344  
 1345  
 1346  
 1347  
 1348  
 1349  
 1350  
 1351  
 1352  
 1353  
 1354  
 1355  
 1356  
 1357  
 1358  
 1359  
 1360  
 1361  
 1362  
 1363  
 1364  
 1365  
 1366  
 1367  
 1368  
 1369  
 1370  
 1371  
 1372  
 1373  
 1374  
 1375  
 1376  
 1377  
 1378  
 1379  
 1380  
 1381  
 1382  
 1383  
 1384  
 1385  
 1386  
 1387  
 1388  
 1389  
 1390  
 1391  
 1392  
 1393  
 1394  
 1395  
 1396  
 1397  
 1398  
 1399  
 1400  
 1401  
 1402  
 1403  
 1404  
 1405  
 1406  
 1407  
 1408  
 1409  
 1410  
 1411  
 1412  
 1413  
 1414  
 1415  
 1416  
 1417  
 1418  
 1419  
 1420  
 1421  
 1422  
 1423  
 1424  
 1425  
 1426  
 1427  
 1428  
 1429  
 1430  
 1431  
 1432  
 1433  
 1434  
 1435  
 1436  
 1437  
 1438  
 1439  
 1440  
 1441  
 1442  
 1443  
 1444  
 1445  
 1446  
 1447  
 1448  
 1449  
 1450  
 1451  
 1452  
 1453  
 1454  
 1455  
 1456  
 1457  
 1458  
 1459  
 1460  
 1461  
 1462  
 1463  
 1464  
 1465  
 1466  
 1467  
 1468  
 1469  
 1470  
 1471  
 1472  
 1473  
 1474  
 1475  
 1476  
 1477  
 1478  
 1479  
 1480  
 1481  
 1

951  
 1081  
 1171  
 1261  
 1351  
 1441  
 1531  
 1621  
 1711  
 1801

1891

1991  
1990  
1989  
1988  
1987  
1986  
1985  
1984  
1983  
1982  
1981  
1980  
1979  
1978  
1977  
1976  
1975  
1974  
1973  
1972  
1971  
1970  
1969  
1968  
1967  
1966  
1965  
1964  
1963  
1962  
1961  
1960  
1959  
1958  
1957  
1956  
1955  
1954  
1953  
1952  
1951  
1950  
1949  
1948  
1947  
1946  
1945  
1944  
1943  
1942  
1941  
1940  
1939  
1938  
1937  
1936  
1935  
1934  
1933  
1932  
1931  
1930  
1929  
1928  
1927  
1926  
1925  
1924  
1923  
1922  
1921  
1920  
1919  
1918  
1917  
1916  
1915  
1914  
1913  
1912  
1911  
1910  
1909  
1908  
1907  
1906  
1905  
1904  
1903  
1902  
1901  
1900  
1899  
1898  
1897  
1896  
1895  
1894  
1893  
1892  
1891  
1890  
1889  
1888  
1887  
1886  
1885  
1884  
1883  
1882  
1881  
1880  
1879  
1878  
1877  
1876  
1875  
1874  
1873  
1872  
1871  
1870  
1869  
1868  
1867  
1866  
1865  
1864  
1863  
1862  
1861  
1860  
1859  
1858  
1857  
1856  
1855  
1854  
1853  
1852  
1851  
1850  
1849  
1848  
1847  
1846  
1845  
1844  
1843  
1842  
1841  
1840  
1839  
1838  
1837  
1836  
1835  
1834  
1833  
1832  
1831  
1830  
1829  
1828  
1827  
1826  
1825  
1824  
1823  
1822  
1821  
1820  
1819  
1818  
1817  
1816  
1815  
1814  
1813  
1812  
1811  
1810  
1809  
1808  
1807  
1806  
1805  
1804  
1803  
1802  
1801  
1800  
1799  
1798  
1797  
1796  
1795  
1794  
1793  
1792  
1791  
1790  
1789  
1788  
1787  
1786  
1785  
1784  
1783  
1782  
1781  
1780  
1779  
1778  
1777  
1776  
1775  
1774  
1773  
1772  
1771  
1770  
1769  
1768  
1767  
1766  
1765  
1764  
1763  
1762  
1761  
1760  
1759  
1758  
1757  
1756  
1755  
1754  
1753  
1752  
1751  
1750  
1749  
1748  
1747  
1746  
1745  
1744  
1743  
1742  
1741  
1740  
1739  
1738  
1737  
1736  
1735  
1734  
1733  
1732  
1731  
1730  
1729  
1728  
1727  
1726  
1725  
1724  
1723  
1722  
1721  
1720  
1719  
1718  
1717  
1716  
1715  
1714  
1713  
1712  
1711  
1710  
1709  
1708  
1707  
1706  
1705  
1704  
1703  
1702  
1701  
1700  
1699  
1698  
1697  
1696  
1695  
1694  
1693  
1692  
1691  
1690  
1689  
1688  
1687  
1686  
1685  
1684  
1683  
1682  
1681  
1680  
1679  
1678  
1677  
1676  
1675  
1674  
1673  
1672  
1671  
1670  
1669  
1668  
1667  
1666  
1665  
1664  
1663  
1662  
1661  
1660  
1659  
1658  
1657  
1656  
1655  
1654  
1653  
1652  
1651  
1650  
1649  
1648  
1647  
1646  
1645  
1644  
1643  
1642  
1641  
1640  
1639  
1638  
1637  
1636  
1635  
1634  
1633  
1632  
1631  
1630  
1629  
1628  
1627  
1626  
1625  
1624  
1623  
1622  
1621  
1620  
1619  
1618  
1617  
1616  
1615  
1614  
1613  
1612  
1611  
1610  
1609  
1608  
1607  
1606  
1605  
1604  
1603  
1602  
1601  
1600  
1599  
1598  
1597  
1596  
1595  
1594  
1593  
1592  
1591  
1590  
1589  
1588  
1587  
1586  
1585  
1584  
1583  
1582  
1581  
1580  
1579  
1578  
1577  
1576  
1575  
1574  
1573  
1572  
1571  
1570  
1569  
1568  
1567  
1566  
1565  
1564  
1563  
1562  
1561  
1560  
1559  
1558  
1557  
1556  
1555  
1554  
1553  
1552  
1551  
1550  
1549  
1548  
1547  
1546  
1545  
1544  
1543  
1542  
1541  
1540  
1539  
1538  
1537  
1536  
1535  
1534  
1533  
1532  
1531  
1530  
1529  
1528  
1527  
1526  
1525  
1524  
1523  
1522  
1521  
1520  
1519  
1518  
1517  
1516  
1515  
1514  
1513  
1512  
1511  
1510  
1509  
1508  
1507  
1506  
1505  
1504  
1503  
1502  
1501  
1500  
1499  
1498  
1497  
1496  
1495  
1494  
1493  
1492  
1491  
1490  
1489  
1488  
1487  
1486  
1485  
1484  
1483  
1482  
1481  
1480  
1479  
1478  
1477  
1476  
1475  
1474  
1473  
1472  
1471  
1470  
1469  
1468  
1467  
1466  
1465  
1464  
1463  
1462  
1461  
1460  
1459  
1458  
1457  
1456  
1455  
1454  
1453  
1452  
1451  
1450  
1449  
1448  
1447  
1446  
1445  
1444  
1443  
1442  
1441  
1440  
1439  
1438  
1437  
1436  
1435  
1434  
1433  
1432  
1431  
1430  
1429  
1428  
1427  
1426  
1425  
1424  
1423  
1422  
1421  
1420  
1419  
1418  
1417  
1416  
1415  
1414  
1413  
1412  
1411  
1410  
1409  
1408  
1407  
1406  
1405  
1404  
1403  
1402  
1401  
1400  
1399  
1398  
1397  
1396  
1395  
1394  
1393  
1392  
1391  
1390  
1389  
1388  
1387  
1386  
1385  
1384  
1383  
1382  
1381  
1380  
1379  
1378  
1377  
1376  
1375  
1374  
1373  
1372  
1371  
1370  
1369  
1368  
1367  
1366  
1365  
1364  
1363  
1362  
1361  
1360  
1359  
1358  
1357  
1356  
1355  
1354  
1353  
1352  
1351  
1350  
1349  
1348  
1347  
1346  
1345  
1344  
1343  
1342  
1341  
1340  
1339  
1338  
1337  
1336  
1335  
1334  
1333  
1332  
1331  
1330  
1329  
1328  
1327  
1326  
1325  
1324  
1323  
1322  
1321  
1320  
1319  
1318  
1317  
1316  
1315  
1314  
1313  
1312  
1311  
1310  
13

1951

060 6C1 001 CCR 001 A1A 011 666 010 001 600 C00 C01 C1A Y1Y 661 670 7C1 011 001 000 661 600 C11 T01 010 601 001 011  
2071

2071

ZIGZAG

2151

2231  
 CCG AIC GGG TTA AAA ACC GAT GTG ACC GAT CAT ATT CAT CCG GTA TCC AAT TTA GTG GAT TGT TTA TCA GAA TTT GGT CIG GAI

2251

644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

222

501 ACA CCA CAC CCG GCG TCG ACA GGA AGT ACA GAT ATT ACC ATC CAA GGA GGA GAT GAC GTA TTC AAA CAG AAT TAC GTC ACA CTA  
 233

2000

2521  
 2522  
 2523  
 2524  
 2525  
 2526  
 2527  
 2528  
 2529  
 2530  
 2531  
 2532  
 2533  
 2534  
 2535  
 2536  
 2537  
 2538  
 2539  
 2540  
 2541  
 2542  
 2543  
 2544  
 2545  
 2546  
 2547  
 2548  
 2549  
 2550  
 2551  
 2552  
 2553  
 2554  
 2555  
 2556  
 2557  
 2558  
 2559  
 2560  
 2561  
 2562  
 2563  
 2564  
 2565  
 2566  
 2567  
 2568  
 2569  
 2570  
 2571  
 2572  
 2573  
 2574  
 2575  
 2576  
 2577  
 2578  
 2579  
 2580  
 2581  
 2582  
 2583  
 2584  
 2585  
 2586  
 2587  
 2588  
 2589  
 2590  
 2591  
 2592  
 2593  
 2594  
 2595  
 2596  
 2597  
 2598  
 2599  
 2600  
 2601  
 2602  
 2603  
 2604  
 2605  
 2606  
 2607  
 2608  
 2609  
 2610  
 2611  
 2612  
 2613  
 2614  
 2615  
 2616  
 2617  
 2618  
 2619  
 2620  
 2621  
 2622  
 2623  
 2624  
 2625  
 2626  
 2627  
 2628  
 2629  
 2630  
 2631  
 2632  
 2633  
 2634  
 2635  
 2636  
 2637  
 2638  
 2639  
 2640  
 2641  
 2642  
 2643  
 2644  
 2645  
 2646  
 2647  
 2648  
 2649  
 2650  
 2651  
 2652  
 2653  
 2654  
 2655  
 2656  
 2657  
 2658  
 2659  
 2660  
 2661  
 2662  
 2663  
 2664  
 2665  
 2666  
 2667  
 2668  
 2669  
 2670  
 2671  
 2672  
 2673  
 2674  
 2675  
 2676  
 2677  
 2678  
 2679  
 2680  
 2681  
 2682  
 2683  
 2684  
 2685  
 2686  
 2687  
 2688  
 2689  
 2690  
 2691  
 2692  
 2693  
 2694  
 2695  
 2696  
 2697  
 2698  
 2699  
 2700  
 2701  
 2702  
 2703  
 2704  
 2705  
 2706  
 2707  
 2708  
 2709  
 2710  
 2711  
 2712  
 2713  
 2714  
 2715  
 2716  
 2717  
 2718  
 2719  
 2720  
 2721  
 2722  
 2723  
 2724  
 2725  
 2726  
 2727  
 2728  
 2729  
 2730  
 2731  
 2732  
 2733  
 2734  
 2735  
 2736  
 2737  
 2738  
 2739  
 2740  
 2741  
 2742  
 2743  
 2744  
 2745  
 2746  
 2747  
 2748  
 2749  
 2750  
 2751  
 2752  
 2753  
 2754  
 2755  
 2756  
 2757  
 2758  
 2759  
 2760  
 2761  
 2762  
 2763  
 2764  
 2765  
 2766  
 2767  
 2768  
 2769  
 2770  
 2771  
 2772  
 2773  
 2774  
 2775  
 2776  
 2777  
 2778  
 2779  
 2780  
 2781  
 2782  
 2783  
 2784  
 2785  
 2786  
 2787  
 2788  
 2789  
 2790  
 2791  
 2792  
 2793  
 2794  
 2795  
 2796  
 2797  
 2798  
 2799  
 2800  
 2801  
 2802  
 2803  
 2804  
 2805  
 2806  
 2807  
 2808  
 2809  
 2810  
 2811  
 2812  
 2813  
 2814  
 2815  
 2816  
 2817  
 2818  
 2819  
 2820  
 2821  
 2822  
 2823  
 2824  
 2825  
 2826  
 2827  
 2828  
 2829  
 2830  
 2831  
 2832  
 2833  
 2834  
 2835  
 2836  
 2837  
 2838  
 2839  
 2840  
 2841  
 2842  
 2843  
 2844  
 2845  
 2846  
 2847  
 2848  
 2849  
 2850  
 2851  
 2852  
 2853  
 2854  
 2855  
 2856  
 2857  
 2858  
 2859  
 2860  
 2861  
 2862  
 2863  
 2864  
 2865  
 2866  
 2867  
 2868  
 2869  
 2870  
 2871  
 2872  
 2873  
 2874  
 2875  
 2876  
 2877  
 2878  
 2879  
 2880  
 2881  
 2882  
 2883  
 2884  
 2885  
 2886  
 2887  
 2888  
 2889  
 2890  
 2891  
 2892  
 2893  
 2894  
 2895  
 2896  
 2897  
 2898  
 2899  
 2900  
 2901  
 2902  
 2903  
 2904  
 2905  
 2906  
 2907  
 2908  
 2909  
 2910  
 2911  
 2912  
 2913  
 2914  
 2915  
 2916  
 2917  
 2918  
 2919  
 2920  
 2921  
 2922  
 2923  
 2924  
 2925  
 2926  
 2927  
 2928  
 2929  
 2930  
 2931  
 2932  
 2933  
 2934  
 2935  
 2936  
 2937  
 2938  
 2939  
 2940  
 2941  
 2942  
 2943  
 2944  
 2945  
 2946  
 2947  
 2948  
 2949  
 2950  
 2951  
 2952  
 2953  
 2954  
 2955  
 2956  
 2957  
 2958  
 2959  
 2960  
 2961  
 2962  
 2963  
 2964  
 2965  
 2966  
 2967  
 2968  
 2969  
 2970  
 2971  
 2972  
 2973  
 2974  
 2975

1321

665 181 01C 600 607 AGI CBA GAC TIA GBA ATC TAT TTG AIC ECG TAC BAY OCA BAA CAC GAB ATA CIA BAY 616 CCA 60C ACB 66T 1CC  
3811

222

11A 166 CCG CTT 1LA 6CC CAA AGT CCA ATC GGA AAG TGT GGA AAA CCG GCG CCA CAC CTT GAA TGG AAJ CCI GAI CTA GAI  
3701

107

978 971 171 171

De façon particulière, des séquences de nucléotides de l'invention codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis comprennent ou sont constituées par l'enchaînement (III) défini précédemment.

L'enchaînement (III), compris dans la séquence de nucléotides de l'invention, contient 2711 nucléotides. Ce fragment comprend notamment le promoteur potentiel du gène de la  $\delta$ -endotoxine active sur S.littoralis.

Entrent naturellement dans le cadre de la présente invention, des séquences de nucléotides modifiées par rapport aux enchaînements (I) ou (III) décrits ci-dessus, dans la mesure où ces modifications ne génèrent pas des variations sensibles de la toxicité du polypeptide codé par la séquence modifiée, vis-à-vis de S.littoralis.

Ces modifications peuvent par exemple consister en des délétions, substitutions, recombinaisons.

Ainsi les séquences de nucléotides (I) et (III) comportent en leur position 611 un nucléotide variable correspondant à l'adénine (A) dans la séquence (I) et à la cytosine (C) dans la séquence (III). Ces nucléotides entrent dans la composition des codons respectifs GAA et GCA qui codent respectivement pour les acides aminés acide glutamique (GLU) et alanine (ALA) dans les séquences respectives II et IV.

De même toute séquence de nucléotides hybridable avec celle des enchaînements (I) ou (III), telle qu'obtenue par transformation enzymatique inverse de l'ARN correspondant ou encore par synthèse chimique entre également dans le cadre des définitions de l'invention.

La séquence de nucléotides de formule (III) commence par un codon d'initiation ATG situé en position 241 et qui représente le début d'une phase ouverte de

13

lecture de 2470 nucléotides.

L'invention concerne en outre une séquence de nucléotides caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV) d'acides aminés ci-après :

5

10

15

20

25

30

35

PET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE

271 PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE SER LEU SER

281 LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL VAL THR GLY ILE VAL GLY PRO SER

431 GLN THR ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU

541 LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU THR GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE

631 ARG ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR

721 ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG THR GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU

811 CYS TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER

901 THR TYR GLN ASP THR ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

991

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER  
 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE  
 THR ASP TRP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TRP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ASN ILE THR SER PRO  
 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG  
 LEU LEU GLN PRO CYS GLN ARG HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY GLU VAL PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYR  
 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS  
 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR GLY VAL PHE SER TRP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN  
 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TRP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE  
 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG  
 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL



1904 PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR THR ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE  
 1907 ARG ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE  
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA GLN LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN  
 2101 GLN ILE GLY LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP  
 2231 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE  
 2341 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU  
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA THR THR ARG TYR GLU LEU ARG  
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER  
 2611 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP  
 2701 CYS SER CYS

L'invention se rapporte également aux vecteurs recombinants d'expression et de clonage comportant plus particulièrement au moins une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, en particulier au moins une  
5 partie de la séquence d'environ 3kb.

Un vecteur recombinant particulier est par exemple un plasmide comprenant le fragment HindIII-PstI de la séquence de nucléotides de l'invention, inséré dans un vecteur pUC9. Un premier vecteur préféré est le plasmide pHT71 dont la construction est rapportée dans les  
10 ensembles ci-après, qui comprend un fragment d'ADN HindIII-PstI selon l'invention constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29.

Un autre vecteur recombinant est constitué par le plasmide pHT 671 dont la construction est donnée dans  
15 la figure 4. Ce plasmide comprend un fragment HindIII-PstI chimère, obtenu en fusionnant un fragment d'ADN HindIII-HindII de 1,1 kb provenant de la souche entomocidus 6-01 avec un fragment HincII-PstI de 1,9 kb issu de la souche aizawai 7-29.  
20

Entrent également dans le cadre de l'invention les souches bactériennes modifiées qui comportent l'une des séquences nucléotides définies ci-dessus ou encore un vecteur recombinant d'expression et de clonage défini  
25 précédemment, de préférence le plasmide pHT 671 ou le plasmide pHT71.

L'invention vise en outre un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, s'attaquant aux  
30 feuilles de coton ou des autres cultures telles qu'énumérées ci-dessus, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

35 L'invention vise plus particulièrement la

partie  $\text{NH}_2$ -terminale de ce polypeptide qui renferme l'activité larvicide.

L'extrémité de la partie  $\text{NH}_2$ -terminale active répond à la séquence (II) d'acides aminés donnée ci-dessus.

Un polypeptide préféré de l'invention est celui qui répond à cette séquence (II) et répond à la séquence (IV) d'acides aminés donnée dans les pages précédentes.

Ce polypeptide répondant à la séquence (IV) comprend 823 acides aminés. Sa masse moléculaire calculée est de 92906 Da.

Cette séquence de  $\delta$ -endotoxine a été comparée aux séquences en acides aminés des  $\delta$ -endotoxines provenant d'autres souches de B. thuringiensis actives sur les lépidoptères et dont les gènes ont été isolés et séquencés précédemment : il s'agit des  $\delta$ -endotoxines des souches kurstaki HD1 (19), kurstaki HD73 (20), berliner 1715 (21) et (22) Sotto (23) et aizawai IPL7 (24).

Les résultats de ces comparaisons indiquent que toutes sont différentes dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620) alors que la partie  $\text{NH}_2$  terminale (acides aminés 1 à 280) et le domaine  $\text{COOH}$  terminal (acides aminés 621 à 1175) de la protéine sont très conservés et ne diffèrent que par quelques acides aminés. En revanche la  $\delta$ -endotoxine correspondant à la séquence (IV) ci-dessus présente des différences importantes avec les autres  $\delta$ -endotoxines, aussi bien dans la partie  $\text{NH}_2$  terminale (acides aminés 1 à 280) que dans le second quart de la molécule (acides aminés 281 à 620). Les résultats de ces comparaisons indiquent encore que la moitié  $\text{NH}_2$ -terminale de la molécule (acides aminés 1 à 620) qui correspond à la fraction toxique de la protéine ne présente que 46% d'homologie avec les autres  $\delta$ -endotoxines. Les différences les plus importantes se situent dans la seconde moitié de la partie toxique de la

molécule (acides aminés 281 à 620) avec seulement 36% d'acides aminés identiques, la partie NH<sub>2</sub>-terminale (acides aminés 1 à 280) présentant quant à elle 58% d'acides aminés identiques avec les autres  $\delta$ -endotoxines.

5 De telles différences importantes n'ont jamais été observées jusqu'à présent dans la partie NH<sub>2</sub>-terminale de la fraction toxique de la molécule, parmi les  $\delta$ -endotoxines actives sur les lépidoptères.

Pour obtenir une séquence de nucléotides entrant dans le cadre de l'invention, codant pour au moins la partie active d'un polypeptide présentant une toxicité spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, on a recours, conformément à l'invention, aux étapes suivantes, à savoir :

15 - la réalisation d'une hybridation moléculaire entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis active contre S.littoralis, et d'autre part au moins deux séquences de nucléotides, utilisées comme sondes, provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène de  $\delta$ -endotoxine de B.thuringiensis, cette partie codant pour la partie NH<sub>2</sub>-terminale du polypeptide actif sur les larves de lépidoptères et de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du polypeptide,

25 - l'isolement du fragment hybridé,  
- son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

De manière avantageuse, les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène de  $\delta$ -endotoxine provenant de la souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de 130 kDa, active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

Dans un mode de réalisation du procédé précédent, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de

clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant d'une unique souche de B.thuringiensis, de préférence aizawai 7.29. En particulier ce fragment est porté préférentiellement par le  
5 plasmide recombinant pHTA6 tel qu'isolé à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à  
10 partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotides issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de  
15 clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins deux souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou  
20 partie des séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif, de manière préférentielle, vis-à-vis de S.littoralis.

Dans ce cas, le fragment recombiné utilisé dans l'étape de clonage est un fragment de 3kb environ,  
25 élaboré avantageusement à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII d'environ 1,1kb provenant de la souche entomocidus 6.01 et d'un fragment HincII-PstI d'environ 1,9kb de la souche aizawai 7.29. Il correspond à un gène tronqué de  $\delta$ -endotoxine.

30 Les fragments de restriction HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés plus spécialement par les plasmides recombinants respectifs pHTE6 et pHTA6 tels qu'isolés à l'aide de la sonde constituée par le fragment PvuII dont question ci-dessus.

35 L'étude de la toxicité, vis-à-vis des larves de

l'épidoptères, des souches bactériennes modifiées à l'aide des séquences de nucléotides définies ci-dessus, a permis de mettre en évidence leur activité toxique élevée, notamment à l'égard des chenilles de S.littoralis.

5 Cette activité a été appréciée au regard de l'indice de spécificité correspondant au rapport  
CL50 S.littoralis

---

CL50 P.brassicae

10 dans lequel "CL50" représente la concentration létale tuant 50% des larves en 72 heures.

L'utilisation d'un tel indice permet d'évaluer l'activité des souches bactériennes étudiées sans avoir à considérer le taux d'expression des polypeptides.

15 Les résultats obtenus, qui sont rapportés dans les exemples qui suivent, et les valeurs de DL 50 qui en sont déduites, ont montré que les souches bactériennes modifiées selon l'invention présentent une activité toxique vis-à-vis de S.littoralis plus spécifique que les  
20 protéines de cristal natives des souches azawai 7-29 ou berliner 1715.

L'invention vise donc l'application, pour l'élaboration de compositions larvicides toxiques de préférence vis-à-vis de S.littoralis, de ces souches  
25 modifiées, de vecteurs recombinants renfermant les séquences nucléotidiques définies plus haut, en particulier du plasmide pHT671 et du plasmide pHT71, et de ces séquences elles-mêmes.

Les compositions larvicides de l'invention sont  
30 alors caractérisées en ce qu'elles renferment une quantité efficace de polypeptides tels que définis ci-dessus ou exprimés par les séquences nucléotidiques évoquées plus haut.

Pour produire ces polypeptides on met avanta-  
35 geusement en oeuvre les gènes tronqués de  $\delta$ -endotoxine

correspondant aux séquences nucléotidiques de l'invention.

Ces gènes peuvent être utilisés pour produire en excès le polypeptide toxique dans des microorganismes permettant l'expression des vecteurs recombinants ci-dessus. Des souches de microorganismes appropriées comprennent E.coli ou encore B.subtilis.

Ces gènes tronqués peuvent être réintroduits dans les souches de B.thuringiensis ou dans des espèces apparentées telle que B.cereus, selon les techniques classiques, par exemple, par transformation, conjugaison ou transduction. Ces techniques permettent de produire le polypeptide toxique en grande quantité sans avoir à modifier au préalable la région naturelle du promoteur des gènes de  $\delta$ -endotoxine de B.thuringiensis.

Cette transformation peut être effectuée en utilisant des méthodes dérivées de la transformation des protoplastes de B.subtilis selon (11) ou des cellules végétatives de B.thuringiensis comme décrit dans (12).

L'introduction de plasmides recombinants par un système de type conjugaison, peut être réalisée en utilisant B.thuringiensis comme souche hôte et B.subtilis ou Streptococcus faecalis comme souches de type donneur, en opérant selon (13) et (14).

En variante, les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences. L'introduction peut être effectuée dans des microorganismes tels que Pseudomonas en opérant selon le procédé décrit dans (17), par l'intermédiaire de vecteurs plasmidiques contenant le transposon Tn5 et le gène de la toxine, ou Azospirillum ou Rhizobium par l'intermédiaire de vecteurs suicides dérivés du plasmide RP4 et de plasmides mobilisateurs fonctionnels chez les

bactéries gram négatives (pRK2013 par exemple) selon les procédés décrits dans (18).

Les gènes tronqués sont seuls dans les souches de Bacilli, ou en variante sont associés à différents gènes de  $\delta$ -endotoxine ce qui permet d'obtenir des cristaux synthétisés par ces souches spécifiquement toxiques, vis-à-vis d'espèces données de Noctuelles, ou toxiques à la fois vis-à-vis des Noctuelles et d'insectes sensibles aux autres  $\delta$ -endotoxines. Ces recombinaisons, effectuées in vitro ou in vivo avec les séquences nucléotidiques de l'invention et d'autres gènes de  $\delta$ -endotoxines présentant des spécificités toxiques différentes, conduisent à la construction de nouveaux gènes codant pour de nouvelles protéines toxiques hybrides présentant un large spectre d'activité vis-à-vis des insectes. Ces nouveaux gènes et ces nouvelles protéines entrent également dans le cadre de l'invention.

Dans ces applications, les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être transférées et exprimées dans des plantes sensibles à S.littoralis afin de diminuer les ravages causés par ces insectes.

Parmi les plantes à protéger, on citera : le coton, le trèfle, la tomate et la luzerne.

Le transfert du gène tronqué dans des plants de coton, peut être réalisé par transformation mettant en jeu des souches telles que Agrobacterium comme décrit dans (15).

L'invention concerne en outre les cellules végétales, les plantes et les graines renfermant les séquences nucléotidiques définies ci-dessus.

Les cellules végétales selon l'invention sont des cellules dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que



définie ci-dessus. L'invention concerne également les cellules végétales issues de leur division.

Les plantes selon l'invention sont des plantes transformées par un procédé non essentiellement biologique, ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides telle que définie ci-dessus, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis. Il s'agit aussi de plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication ou de croisements hybrides.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans leur génome par manipulation génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

L'invention vise en outre des graines capables de donner une plante telle que définie ci-dessus ou issues d'une telle plante, caractérisées en ce qu'elles ont intégré dans leur génome, par manipulation génétique une séquence de nucléotide décrite plus haut.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaîtront dans la suite de la description et en se reportant aux exemples dans lesquels :

- la figure 1 représente la carte de restriction des plasmides PHTA6 et PHTe6,
- la figure 2, la carte de restriction d'un gène d'une protéine de cristal de la souche aizawai 7.29 cloné dans le plasmide PHTA2 et définissant les fragments d'ADN qui sont utilisés comme sonde,
- la figure 3, présente le fragment de 6,6kb cloné dans

pHTA6 et le résultat d'une hybridation effectuée entre ce fragment et les sondes décrites dans la figure 2,

- la figure 4, la carte de restriction du plasmide pHT671, et

5 - la figure 5, les photographies de tests d'immunodiffusion.

Les expériences d'hybridation réalisées pour la mise en oeuvre de l'invention ont été effectuées à 42°C pendant 24 h. dans une solution contenant 5 x SSC, 30% de formamide et 1 Denhardt (7) en présence de la sonde ADN  
10 marquée au <sup>32</sup>P. Les filtres sont lavés à 42°C, 20 mn, en utilisant successivement les solutions suivantes :  
5 x SSC dans 30% de formamide, 5 x SSC, 2 x SSC, 1 x SSC et 0,5 x SSC avant séchage à température ambiante.

15 EXEMPLE I - Construction d'une séquence d'ADN de 3kb environ contenant un gène chimère d'une toxine insecticide

Cette construction comprend :

- 20 1/ la préparation de banques de gènes de B. thuringiensis  
2/ la sélection et la caractérisation des clones transformants renfermant les gènes d'une protéine du cristal et des séquences nucléotidiques responsables de l'activité larvicide,  
25 3/ recombinaison in vitro de ces séquences dans un vecteur de clonage avec construction du plasmide pHT671.

Ces différentes étapes sont réalisées comme suit :

1/ Préparation de banques de gènes de B. thuringiensis.

30 L'ADN total des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01 de Bacillus thuringiensis est purifié en utilisant la méthode rapportée dans (1) et 50µg de chaque ADN purifié sont complètement digérés avec l'enzyme de restriction PstI.

35

L'ADN digéré par PstI est analysé par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et des fragments d'ADN d'une taille de 5 à 8 kb sont récupérés à partir des gels d'agarose, par électroélution, de la manière décrite dans (2).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la souche aizawai 7-29 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC18 digéré par PstI selon (3).

Les fragments d'ADN purifiés de 5-8 kb de la chaîne entomocidus 6-01 sont ligaturés à l'ADN du vecteur de clonage pUC9 digéré par PstI. Les cellules de E.coli JM83 sont transformées avec le mélange de ligature comme décrit dans (4).

Les clones transformants de E.coli sont sélectionnés sur milieu LB contenant 100 µg/ml d'ampicilline.

2/ Isolement et caractérisation des clones transformants contenant les gènes d'une protéine de cristal.

A/ Criblage des cellules de E.coli transformées à l'aide d'un fragment interne d'un gène de la protéine du cristal marqué au <sup>32</sup>P, utilisé comme sonde :

Des clones transformants contenant des plasmides recombinants portant le gène du cristal sont détectés par hybridation sur colonies, suivant la méthode décrite dans (5), en utilisant comme sonde un fragment PvuII de 2 kb du plasmide pBT 15-88 correspondant à une partie interne du gène de la protéine du cristal, situé sur le chromosome de la souche berliner 1715.

B/ Caractérisation des plasmides recombinants présents dans les clones qui réagissent avec la sonde ci-dessus.

Deux plasmides recombinants, pHTA6 et pHTE6, isolés respectivement des banques de gènes construites à

partir des souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01, présentent une homologie avec cette sonde. Dans chaque cas, un fragment d'ADN d'environ 6,6 kb a été cloné.

La carte de restriction des deux plasmides est donnée sur la figure 1. La comparaison des sites de restriction montre que les deux fragments d'ADN clonés semblent identiques.

Afin de délimiter les séquences correspondant au gène de la  $\delta$ -endotoxine, différents fragments d'ADN marqués au  $^{32}\text{P}$ , provenant d'un gène du cristal précédemment caractérisé, et cloné dans le plasmide recombinant pHTA2, sont utilisés comme sondes. Ce dernier gène du cristal également originaire de la souche aizawai 7-29 code pour une protéine de 130 kd active contre P. bras-  
sicae mais pas contre S. littoralis. Ce type de gène possède la même carte de restriction que le gène de la  $\delta$ -endotoxine issu de la souche berliner 1715. Sur la figure 2, on a rapporté la carte de restriction de ce gène de la protéine du cristal de la souche de aizawai 7.29 cloné dans le plasmide pHTA2. Les traits épais indiqués au-dessus de la carte correspondent aux fragments utilisés comme sondes d'hybridation.

Les plasmides pHTA6 et pHTE6 sont hydrolysés par différentes endonucléases de restriction, analysés par électrophorèse horizontale sur gel d'agarose à 0,8% et hybridés avec les différentes sondes.

Le transfert de l'ADN sur des filtres de nitrocellulose est réalisé suivant la méthode de SOUTHERN décrite dans (6). L'hybridation est conduite à 42°C pendant 24 heures dans une solution contenant : 5X SSC, 30% de formamide et un mélange 1X Denhardt décrit dans (7) en présence d'une sonde d'ADN marquée au  $^{32}\text{P}$ . Les filtres sont ensuite lavés à 42°C pendant 20 minutes, en utilisant successivement les solutions suivantes : 5 SSC dans 50% de formamide, 5 SSC, 2 SSC, 1 SSC et 0,5 SSC

avant d'être séchés à la température ambiante.

Les résultats de ces expériences d'hybridation sont résumés sur la figure 3. Il apparaît que chaque extrémité des fragments d'ADN de 6,6 kb clonés présente une homologie avec les sondes. Le fragment PstI-KpnI de 1,5 kb réagissant avec la sonde n° 3 correspond à l'extrémité 3' d'un gène de la protéine du cristal présent à la fois dans les souches aizawai 7-29 et entomocidus 6-01. Comme il est indiqué sur la figure 3, les sondes n° 1 et n° 2 correspondant à l'extrémité 5' du gène de la  $\delta$ -endotoxine de pHTA2, s'hybrident avec le fragment HindIII-HincII de 1,1 kb contenu dans le plasmide pHTA6. La sonde n° 3 qui couvre l'extrémité 3' du gène de la  $\delta$ -endotoxine de pHTA2, s'hybride avec le fragment HindIII-PstI de 0,4kb contenu dans le plasmide pHTA6. Il doit être noté qu'un faible signal d'hybridation est obtenu avec la sonde n° 2 alors que les deux autres sondes donnent des signaux facilement détectables.

A partir de ces résultats, les inventeurs ont établi que le fragment d'ADN HindIII-PstI de 3 kb correspond à une grande partie d'un gène de la  $\delta$ -endotoxine qui commence près du site HindIII central. Il apparaît clairement au vu des résultats des expériences d'hybridation que le gène de la  $\delta$ -endotoxine présente des différences substantielles avec ceux caractérisés dans l'art antérieur. Sur la base de ces résultats il a été décidé de cloner le fragment de 3 kb HindIII-PstI dans le vecteur pUC9.

### 3/ Construction du plasmide pHT 671 contenant un gène chimère de la toxine insecticide reconstitué.

Le fragment d'ADN HindIII-HincII de 1,1 kb issu du plasmide pHT6 et le fragment d'ADN HincII-PstI de 1,9kb issu du plasmide pHTA6 sont purifiés sur gels d'agarose.

Des quantités égales des deux fragments d'ADN purifiés et de l'ADN de pUC9 digéré avec HindIII et PstI sont mélangées et ligaturées. Le mélange de ligature est utilisé pour transformer des cellules compétentes de E. coli JM83, puis les cellules transformées de E. coli sont sélectionnées sur milieu LB contenant de l'ampicilline. L'un des clones recombinants intéressant examiné contient un plasmide désigné par pHT671, dont la carte de restriction a été déterminée et est représentée sur la figure 4. Ce plasmide (pHT671) contient un fragment d'ADN de 3 kb inséré dans le vecteur pUC9. Cette séquence d'ADN a la même carte de restriction que les fragments HindIII-PstI de 3 kb contenus dans les plasmides pHTA6 et pHTE6, mais correspond à une molécule d'ADN reconstituée construite par recombinaison in vitro à partir de séquences d'ADN provenant des souches aizawai 7-29 d'une part et entomocidus 6-01 d'autre part.

EXEMPLE II : Etude de la séquence nucléotidique de la région du promoteur et de la région codant pour la partie NH<sub>2</sub> terminale de la  $\delta$ -endotoxine active contre les Noctuidae.

Le fragment HindIII-HincII de pHT671 est séquencé conformément à la méthode décrite dans (8) en utilisant un système M13. Pour obtenir des fragments d'ADN clonés se chevauchant partiellement qui seront utilisés dans le séquençage de l'ADN, on a recours à la méthode de sous-clonage par délétion dans M13, développée par DALE et al (9).

La séquence de 940 nucléotides du fragment HindIII-HincII qui est d'une longueur d'environ 1 kilobase correspond à l'enchaînement I ci-dessus.

L'analyse de cette séquence montre que la plus grande phase ouverte de lecture commence à la position 241 et qu'un site potentiel de liaison aux ribosomes GGAGG se trouve six paires de base en amont de ce codon

ATG (position 230 à 235). La région localisée entre les nucléotides 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon ATG) est fortement homologue à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki HD1 Dipel (BTK) séquencée par WONG et al (1983) et décrite dans (16) et dont les auteurs ont montré qu'elle contient trois promoteurs BtI, BtII, et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E.coli respectivement. La comparaison entre les séquences en acides aminés déduites des 750 premiers nucléotides des gènes de BTK et pHT671, montre que ces polypeptides présentent des différences significatives au niveau de la moitié N-terminale de la partie active issue de la protoxine (seulement 66% d'homologie stricte). Il est important de noter que c'est la première fois qu'un gène de la  $\delta$ -endotoxine isolé à partir d'une souche active contre les lépidoptères code pour un polypeptide qui présente des différences substantielles dans cette région. En effet, ce domaine N-terminal apparaît fortement conservé (plus de 97% d'homologie stricte) parmi tous les gènes du cristal actifs sur lépidoptères qui ont été séquencés jusqu'à présent. Par ailleurs, les inventeurs ont montré que le taux de variabilité est du même ordre si l'on considère les séquences nucléotidiques de pHT671 et des autres gènes de type lépidoptères.

EXEMPLE III : Construction d'une séquence d'ADN de 2,7kb environ contenant un gène d'une toxine larvicide.

Pour réaliser cette construction on a utilisé l'ADN de la souche aizawai 7.29 de B.thuringiensis jusqu'à l'étape de réalisation du plasmide pHTA6 telle que décrite dans l'exemple I.

Le fragment HindIII-PstI d'environ 2,7kb obtenu à partir du plasmide pHTA6 a ensuite été sous-cloné dans le vecteur pUC9, préalablement hydrolysé par les enzymes de restriction HindIII-PstI, pour donner le plasmide pHT71.

EXEMPLE IV : Etude de la séquence de nucléotides constituant le plasmide pHT71 codant pour un polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles.

5 Le fragment HindIII-Pst-I de 2,7kb de pHTA6, qui a été sous-cloné dans pHT71, a été séquencé par la technique de Sanger et al.(8) en utilisant le phage M13mp19 et le système de sous-clonage par délétions développé par Dale et al.(9). Ce système permet d'obtenir  
10 des phages M13 contenant une série de fragments d'ADN se chevauchant partiellement et qui peuvent être utilisés pour le séquençage de l'ADN.

La séquence de nucléotides de ce fragment de 2,7kb qui correspond à l'enchaînement (III) donné ci-dessus, a été déterminée sur les 2 brins d'ADN, exception  
15 faite des 212 derniers nucléotides (position 2500 à 2711) qui n'ont été séquencés que sur 1 seul brin.

La séquence nucléotidique de ce fragment Hind-III-PstI a une longueur de 2711 nucléotides. Ce  
20 fragment contient le promoteur potentiel ainsi que la plus grande partie du gène de la  $\delta$ -endotoxine active sur S.littoralis.

EXEMPLE V : Etude de la toxicité spécifique des clones recombinants de E.coli JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) contre S.littoralis.

25 La toxicité des clones recombinants de E.coli JM83 contenant pHT671 et de E.coli JM83 contenant pHT71 a été déterminée par des tests biologiques sur des chenilles de l'espèce P.brassicae et S.littoralis comme décrit par LECADET et MARTOURET dans (10). Les résultats ont été comparés avec la toxicité spécifique des protéines de cristal natives et purifiées à partir des souches berliner 1715 et aizawai 7-29 entomocidus 6.01 B.cereus 569 (contenant le plasmide pBT45, pAM81) contre  
30 les deux espèces d'insectes. La toxicité spécifique du clone recombinant et des souches de B.thuringiensis est



32

exprimée en termes d'"indice de spécificité" défini précédemment.

Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 1 ci-après.

- 5 Dans ce tableau, pour des souches de E.coli, la concentration 1 correspond à une culture bactérienne de 14 heures concentrée 20 fois, désintégrée par ultrasons ; pour les souches de B.thuringiensis la concentration est exprimée en  $\mu\text{g}$  de protéine cristal par  $\mu\text{l}$  de préparation.
- 10 L'activité toxique des préparations a été testée par ingestion forcée sur des chenilles au cinquième stade de développement avec 5  $\mu\text{l}$  de préparation, ou par une technique d'ingestion libre en utilisant des larves au deuxième stade de développement.

15

20

25

30

35

TABLEAU 1

Toxicité comparée d'un clone recombinant et de deux souches de B.thuringiensis vis-à-vis de S.littoralis et P.brassicae.

-----

5	Souches et plasmides	S.littoralis		P.brassicae	Indice de spécificité CL50 <u>S.littoralis</u> CL50 <u>P.brassicae</u>
		CL50 2ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	CL50 5ème stade larvaire	
10	JM83 (pUC18)	> 1	> 1	> 1	-
	JM83 (pHT671)	0,04	0,13	0,72	0,2
	JM83 (pHTA2)	> 1	> 1	0,03	> 30
15	JM83 (pHTA4)	> 1	> 1	> 1	-
	JM83 (pHT71)	ND	0,5	> 1	< 0,5
20	berliner 1715 cristaux natifs	ND	0,11	0,007	15,7
	aizawai 7.29 cristaux natifs	ND	0,02	0,04	0,5
	entomocidus 601 cristaux natifs	ND	0,028	0,012	2,3
25	B.cereus 569 (pBT45,pAM $\beta$ 1)	ND	0,38	0,054	7

L'examen des valeurs de CL50 résumées dans ce tableau 1 montre que les extraits de protéine des clones recombinants JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont préférentiellement toxiques contre S.littoralis. En second lieu une comparaison des valeurs de l'indice de spécificité montre que l'activité larvicide des clones recombinants est plus spécifique à raison de 2,5 fois envers S.littoralis que les protéines du cristal natives de la souche aizawai. Par ailleurs, les clones recombinants de JM83 (pHT671) et JM83 (pHT71) sont très actifs contre un autre insecte de la famille des Noctuidae, Mamestra brassicae (pour le clone JM83 (pHT671) par exemple, la valeur CL50 est de 0,02, en utilisant des larves du deuxième stade de développement).

Ces deux résultats montrent que le gène de la toxine larvicide construit et cloné dans les plasmides pHT671 et pHT71 code pour une protéine spécifiquement active contre S.littoralis.

D'autres préparations obtenues à partir de clones recombinants contenant des plasmides portant des gènes codant pour d'autres types de  $\delta$ -endotoxines (pHTA2 et pHTA4) ne sont pas actives sur S.littoralis : on peut voir que le plasmide pHTA2 code pour une  $\delta$ -endotoxine spécifiquement active sur P.brassicae alors que le plasmide pHTA4 code pour une  $\delta$ -endotoxine dont l'insecte cible n'a pas encore été identifié. On peut également voir que les inclusions cristallines produites par une souche de Bacillus cereus qui a reçu le plasmide pBT45, un des plasmides de la souche aizawai 7.29 qui porte aussi un gène de  $\delta$ -endotoxine (le gène d'origine plasmidique de la souche aizawai 7.29), sont également spécifiquement actives sur P.brassicae.

Des résultats similaires sont obtenus en utilisant, à la place des extraits bactériens bruts, des extraits protéiques solubles préparés à partir de

différents clones recombinants de E.coli.

Sur la base des valeurs de la CL50 rapportées dans le tableau ci-dessus et d'un poids individuel moyen de 41 mg par larve L5 (cinquième stade larvaire) de S.littoralis, la valeur de la DL50 a été estimée à 2,4 µg/gramme de larve pour les cristaux natifs de la souche aizawai 7-29.

Sur ces mêmes bases et sur la base de facteurs d'équivalence permettant de passer de la masse bactérienne totale à la quantité de protéines spécifiques (2% environ des protéines totales chez E.coli JM83 (pHT671), la DL50 correspondant à la toxine produite par l'expression chez E.coli JM83 du gène selon l'invention cloné dans le plasmide pHT671, a été déterminée et estimée à une valeur proche de 5,5 à 6 µg/gramme de larve.

Sur ces mêmes bases et après détermination de la CL50 d'extraits protéiques solubles préparés à partir de cultures broyées de E.coli JM83 (pHT671), la valeur de la DL50 correspondant à la toxine présente dans ces extraits a été estimée à 4,15 µg/gramme de larve.

Dans les deux cas et particulièrement dans le cas des broyats de E.coli, les valeurs de DL50 calculées sont approximatives et supérieures à celle des cristaux natifs, puisqu'il ne s'agit pas de toxine purifiée. Cependant ces données indiquent sans ambiguïté que le gène exprimé par pHT671 détermine une δ-endotoxine présentant la spécificité vis-à-vis de S.littoralis. En effet, le même type d'estimation réalisé avec des extraits de E.coli JM83 (pHTA2) portant un gène de δ-endotoxine de spécificité différente conduit à des valeurs 30 à 50 fois supérieures de la DL50 des extraits solubles, vis-à-vis de S.littoralis (135 à 350 µg/gramme de larve).

Les données qui précèdent permettront aisément à l'homme de l'art d'élaborer des compositions larvicides

36

actives avec les protéines de l'invention.

D'autres expériences de toxicité ont été réalisées en utilisant des larves au deuxième stade larvaire de M.brassicae, S.frugiperda et S.littoralis.

5 Les résultats obtenus, exprimés en termes de LC 50 comme défini pour le tableau 1, sont donnés dans le tableau 2.

10

15

20

25

30

35

TABLEAU 2  
ACTIVITE DES CLONES RECOMBINANTS  
CONTRE LES LARVES D'INSECTES  
DE LA FAMILLE DES NOCTUIDAE  
M. BRASSICAE, S. FRUGIPERDA AND S. LITTORALIS

SOUCHES ET PLASMIDES	LARVE D'INSECTE ET STADE	<u>M. BRASSICAE</u>			<u>S. FRUGIPERDA</u>		<u>S. LITTORALIS</u>	
		CL50 2ème STADE			CL50 2ème STADE		CL50 2ème STADE	
JM 83 (pUC18)		NT		NT	NT		NT	
JM 83 (pHTA2)		> 1		0,51	0,9		0,9	
JM 83 (pHT671)		0,02		0,5	0,03		0,03	
JM 83 (pHT71)		ND		ND	0,03		0,03	
JM 83 (pHTA4)		> 1		0,54	> 1		> 1	

Il ressort de l'examen du tableau 2 que les extraits bactériens bruts du clone recombinant JM83 (pHT671) sont toxiques vis-à-vis de M.brassicae et de S.littoralis (les valeurs de CL50 sont respectivement de 0,02 et 0,03) et faiblement toxiques vis-à-vis de S.frugiperda (CL50 de 0,5).

Les extraits du clone recombinant E.coli JM83 (pHTA2) sont faiblement actifs à l'égard de S.frugiperda et de S.littoralis et pas du tout toxique à l'égard de M.brassicae. Les extraits du clone recombinant JM83 (pHTA4) ne sont pas toxiques vis-à-vis de M.brassicae et de S.littoralis et sont faiblement toxiques à l'égard de S.frugiperda.

Ces résultats confirment la forte toxicité spécifique des protéines obtenues à partir de pHT71 et de pHT671 à l'égard de S.littoralis et montrent que cette classe de protéine de cristal est aussi très active à l'égard de M.brassicae.

EXEMPLE VI : Etude de la spécificité des polypeptides exprimés par les clones formés par introduction des plasmides pHT671 et pHT71 dans E.coli.

Cette étude a été réalisée grâce à des tests d'immuno-diffusion. Les résultats sont rapportés sur la figure 5 (qui comprend les figures 5A et 5B).

La mise en oeuvre de l'expérience d'immuno-diffusion a été réalisée conformément au protocole suivant :

Des extraits solubles de protéines de clones E.coli contenant les plasmides pHT671, pHTA4, pHTA2 ou pHT71, pUC18 ont été placés respectivement dans les puits n° 2, 3, 4, 5, 6. Un échantillon d'un cristal purifié solubilisé de aizawai 7-29 a été placé dans le puits n° 1 afin de servir de contrôle positif.

Dans le test rapporté sur la figure 5A un

antisérum contre toutes les  $\delta$ -endotoxines de aizawai 7.29, contenant des anticorps de lapin dirigés contre les protéines du cristal solubilisées a été utilisé et placé dans le puits central.

5 Une ligne d'immunoprécipitation a été observée dans tous les cas excepté dans le cas de l'extrait de E.coli contenant le vecteur plasmidique seul (puits n° 6).

10 On a remarqué que les lignes d'immunoprécipitation issues des puits n° 4 et n° 5 croisent, ce qui montre que les produits codés par les plasmides pHTA2 et pHT71 respectivement présentent des déterminants antigéniques différents.

15 Dans le test rapporté sur la figure 5B, l'antisérum utilisé contenait des anticorps polyclonaux de lapin contre les protéines du cristal de berliner 1715.

20 Une ligne d'immunoprécipitation a été observée avec les extraits de E.coli JM83 (pHTA4) (puits n° 3) JM83 (pHTA2) (puits n° 4). En revanche les clones E.coli JM83 (pHT71) (puits n° 5) JM83 (pHT671) (puits n° 2) ou JM83 (pUC9) (puits n° 6) ne donnent pas d'immunoprécipitation.

25 On peut en déduire que les gènes du cristal isolés dans pHTA4 et pHTA2 expriment des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de berliner 1715, souche qui n'est pas spécifiquement active vis-à-vis de S.littoralis.

30 En revanche, les extraits bruts de E.coli contenant les plasmides pHT671 et pHT71 contiennent des polypeptides ayant des déterminants antigéniques communs avec les protéines du cristal de la souche aizawai 7.29, qui ne sont pas liés sur le plan immunogène avec les protéines du cristal de la souche berliner 1715.

35 Ces résultats confirment ceux donnés précédemment en rapport avec la spécificité des gènes isolés dans



les plasmides pHT71 et pHT671.

Des essais de précipitation antigène-anticorps ont permis de déterminer le niveau d'expression des gènes de  $\delta$ -endotoxine dans différents clones recombinants.

5 Les résultats obtenus ont montré que la protéine du cristal représente entre 7 et 10% de protéines cellulaires totales de E.coli JM83 (pHTA2), entre 2 et 3% dans E.coli JM83 (pHT671) et entre 0,5 et 1% dans E.coli JM83 (pHTA4) et E.coli, JM83 (pHT71).

10

15

20

25

30

35

Les références bibliographiques dont il est question dans les exemples sont les suivantes :

- 5 (1) Klier, A.F., LECADET, M-M. and DEJONDER, R., 1973, Sequential modifications of RNA polymerase during sporogenesis in Bacillus thuringiensis, Eur. J. Biochem., 36 : 317-327.
- (2) MANIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J., 1982, Molecular cloning : A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New-York
- 10 (3) VIEIRA, J. and MESSING, J., 1982, The pUC plasmids, and M13mp7 derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers, Gene, 19 : 259-268.
- 15 (4) LEDERBERG, E.M. and COHEN, S.N., 1974, Transformation of Salmonella thyphimurium by plasmid deoxyribonucleic acid, J. Bacteriol., 119 : 1072-1074.
- (5) GRUNSTEIN, M. and HOGNESS, D.S., 1975, Colony hybridization, a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,  
20 72 : 3961-3965.
- (6) SOUTHERN, E.M., 1975, Detection of specific sequence among DNA fragments separated by gel electrophoresis, J. Molec. Biol., 98, 503-517.
- 25 (7) DENHARDT, D.T. 1976, A membrane filter taking for the detection of complementary DNA. Biochem. Biophys. Res. Comm., 23 : 641-646.
- (8) SANGER, F., NICKLENS, S. and COULSON, A.R., 1977, DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74 : 5463-5467.
- 30 (9) DALE et al. (1985) A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA, Plasmid 1985, 13 : 31-40
- (10) LECADET, M.M. et MARTOURET D. 1987, Host specificity of  
35 the Bacillus thuringiensis  $\delta$ -endotoxin toward

Lepidopteran species : Spodoptera littoralis Bdv and Pieris brassicae L, J. of Invert. Pathol., 49 (n° 1) : 37-48.

- 5 (11)CHANG et al., 1979, High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA- Mol Gen Genet 168:111 115
- (12)HEIERSON et al., 1987, Transformation of vegetative cells of Bacillus thuringiensis by plasmid DNA, Journal of Bacteriology, Mar.1987, p.1147-1152,
- 10 (13)KLIER et al., 1983, Mating between Bacillus subtilis and Bacillus thuringiensis and transfer of cloned crystal genes, Mol Gen Genet (1983) 191:257 262
- (14)LERECLUS et al., 1983, Isolation of a DNA, sequence related to several plasmids from Bacillus thuringiensis after a mating involving the Streptococcus faecalis plasmid pAMP<sup>1</sup>, Mol Gen Genet (1983) 191:307-313
- 15 (15)UMBECK et al., 1987, Genetically transformed cotton (Gossypium hirsutum L.) plants - Biotechnology vol.5 March 1987.
- 20 (16)WONG et al., 1983, transcriptional and translational start sites for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. of Biol. Chem., 258 : 1960-1967.
- (17)OBUKOWICZ M. et al (1986). Tn<sup>5</sup> mediated integration of the  $\delta$ -endotoxin gene from B. thuringiensis into the chromosome of root colonizing Pseudomonas. J. Bacteriol.,
- 25 168, 982-989.
- (18)SIMON, R. et al, (1983). A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering : transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. Biotechnology, 1, pp. 784-791.
- 30 (19)Schnepf et al, (1985) The amino acid sequence of a crystal protein from Bacillus thuringiensis deduced from the DNA base sequence. J BIOL Chem 260 : 6264-6372.
- (20)Adang et al, (1985) Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of
- 35

Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. Gene 36 : 289-300.

(21)Wabiko et al,(1986) Bacillus thuringiensis entomocidal protoxin gene sequence and gene product analysis.

5 DNA 5 : 305-314.

(22)Hofte et al,(1986) Structural and functional analysis of a cloned  $\delta$ -endotoxin gene of Bacillus thuringiensis berliner 1715. Eur J Biochem 161 : 273-280.

10 (23)Shibano et al,(1986) Complete structure of an insecticidal crystal protein gene from Bacillus thuringiensis. In : Bacillus molecular genetics and biotechnology applications. J.Ganesan, A.T., Hoch, J.A.(eds). Academic Press 307-320.

15 (24)Oeda et al,(1987) Nucleotide sequence of the insecticidal protein gene of Bacillus thuringiensis strain aizawai IPL7 and its high-level expression in Escherichia coli. Gene 53 : 113-119.

20

25

30

35

REVENDICATIONS

- 1/ Séquence de nucléotides codant pour au moins  
5 une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée par sa capacité d'hybridation avec un gène capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de larves de S.littoralis.  
10 2/ Séquence de nucléotides de 3 kb environ correspondant au fragment de restriction HindIII-PstI provenant de B.thuringiensis capable de s'hybrider avec les sondes 1, 2, 3 de pHTA2 rapportées sur la figure 2.
- 15 3/ Séquence selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce qu'elle comporte des sites dans l'ordre suivant :  
Hind III - Hinc II - Bgl II - Kpn I - Hind III - Pst I -  
4/ Séquence de nucléotides selon l'une quelconque  
20 des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est obtenue in vitro à partir d'une souche unique de B.thuringiensis.
- 25 5/ Séquence de nucléotides selon la revendication 4, caractérisée en ce que la souche de B.thuringiensis est la souche aizawai 7.29.
- 6/ Séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce qu'elle est obtenue par recombinaison génétique in vitro de séquences d'ADN de deux souches différentes de B.thuringiensis.
- 30 7/ Séquence selon la revendication 6, caractérisée en ce que les 2 souches de B.thuringiensis correspondent respectivement aux souches entomocidus 6-01 et aizawai 7-29.
- 8/ Séquence de nucléotides, caractérisée en ce  
35 qu'elle code pour un polypeptide capable de former un

45

complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S. littoralis.

9/ Séquence de nucléotides caractérisée en ce  
5 qu'elle a la capacité de s'hybrider avec une sonde formée à partir de la séquence (I) présentant l'enchaînement suivant :

10

15

20

25

30

35

52  
GTC TAC TTG ACA GCG GTA GGA ACA TAA TCG GTC AAT TTT AAA TAT GCG GCA TAT ATT CAT  
112  
ATT TTA TAA AAT TTG TTA CGT TTT TTG TAT TTT TTC ATA ACA TGT GTC ATA TGT ATT AAA  
172  
TCC TGG TAA TGA AAA ACA GTA TCA AAC TAT CAG AAC TTT GGT AGT TTA ATA AAA AAA CGG  
232  
ACG TAT TTT ATG GAG GAA AAT AAT CAA AAT CAA TGC ATA CCT TAC AAT TGT TTA AGT AAT  
292  
CCT GAA GAA GTA CTT TTG GAT GGA GAA CCG ATA TCA ACT GGT AAT TCA TCA ATT GAT ATT  
352  
TCT CTG TCA CTT GTT CAG TTT CTG GTA TCT AAC TTT GTA CCA GCG GGA GGA TTT TTA GTT  
412  
CGA TTA ATA GAT TTT GTA TGG GGA ATA GTT GCG CCT TCT CAA TGG GAT GCA TTT CTA CTA  
472  
CAA ATT GAA CAA TTA ATT AAT GAA AGA ATA GCT GAA TTT GCT ACG AAT GCT GCT ATT GCT  
532  
AAT TTA GAA GGA TTA GGA AAC AAT TTC AAT ATA TAT GTC GAA GCA TTT AAA GAA TGG CAA  
592  
GAA GAT CCT AAT AAT CCA GAA ACC AGG ACC AGA GTA ATT GAT CCG TTT GGT ATA CTT GAT  
652  
CGG CTA CTT GAA AGG GAC ATT CCT TCG TTT CGA ATT TCT GGA TTT GAA GTA CCC CTT TTA  
712  
TCC GTT TAT GCT CAA CCG GCC AAT CTG CAT CTA GCT ATA TTA AGA GAT TCT GTA ATT TTT  
772  
CGA GAA AGA TGG GGA TTG ACA ACG ATA AAT GTC AAT GAA AAC TAT AAT AGA CTA ATT ACG  
832  
CAT ATT GAT GAA TAT GCT GAT CAC TGT GCA AAT ACG TAT AAT CCG GCA TTA AAT AAT TTA  
892  
CCC AAA TCT ACG TAT CAA GAT TGG ATA ACA TAT AAT CCA TTA CCG AGA GAC TTA ACA TTG  
952  
ACT GTA TTA GAT ATC GCC GCT TTC TTT CCA AAC TAT GAC

cu à partir de la séquence (III) présentant l'enchaînement  
suivant :

[illegible]



[illegible]

99 991 331 191

10/ Séquence de nucléotides codant pour un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis des larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend l'enchaînement (I) ou (III) défini à la revendication 9.

11/ Séquence de nucléotides selon la revendication 9 ou 10, caractérisée en ce qu'elle présente un codon d'initiation ATG situé en position 241.

10 12/ Séquence selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisée par un site de liaison aux ribosomes GGAGG en positions 230 à 234.

13/ Séquence selon l'une des revendications 10 à 12, caractérisée en ce qu'elle comporte la séquence comprise entre les nucléotides en position 137 et 177 (position -103 à -63 en amont du codon d'initiation ATG) qui est homologue à raison d'environ au moins 70% à la région présente en amont du gène du cristal de la souche kurstaki-HD1 Dipel (BTK) qui contient les trois promoteurs BtI, BTII et Ec fonctionnels dans B.thuringiensis et E.coli respectivement.

14/ Séquence de nucléotides, caractérisée en ce qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (II) d'acides aminés ci-après :

25

30

35

MET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE PRO TYR ASN CYS LEU SER ASN  
PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER SER ILE ASP ILE  
SER LEU SER LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY GLY PHE LEU VAL  
GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL  
GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA  
ASN LEU GLU GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU  
GLU ASP PRO ASN ASN PRO GLU THR ARG THR ARG VAL ILE ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP  
GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU  
SER VAL TYR ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE  
GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU ASN TYR ASN ARG LEU ILE ARG  
HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU  
PRO LYS SER THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR LEU  
THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

ou qu'elle code pour un polypeptide comprenant la séquence (IV)  
d'acides aminés ci-après :

52

PET GLU GLU ASN ASN GLN ASN GLN CYS ILE

271

PAU TYR ASN CYS LEU SER ASN PRO GLU GLU VAL LEU LEU ASP GLY GLU ARG ILE SER THR GLY ASN SER ILE ASP ILE SER LEU SER

361

LEU VAL GLN PHE LEU VAL SER ASN PHE VAL PRO GLY GLY PHE LEU VAL GLY LEU ILE ASP PHE VAL TRP GLY ILE VAL GLY PRO SER

431

GLN TRP ASP ALA PHE LEU VAL GLN ILE GLU GLN LEU ILE ASN GLU ARG ILE ALA GLU PHE ALA ARG ASN ALA ALA ILE ALA ASN LEU GLU

541

GLY LEU GLY ASN ASN PHE ASN ILE TYR VAL GLU ALA PHE LYS GLU TRP GLU ASP PRO ASN ASN PRO ALA THR ARG THR ARG VAL ILE

631

ASP ARG PHE ARG ILE LEU ASP GLY LEU LEU GLU ARG ASP ILE PRO SER PHE ARG ILE SER GLY PHE GLU VAL PRO LEU LEU SER VAL TYR

721

ALA GLN ALA ALA ASN LEU HIS LEU ALA ILE LEU ARG ASP SER VAL ILE PHE GLY GLU ARG TRP GLY LEU THR THR ILE ASN VAL ASN GLU

811

CYS TYR ASN ARG LEU ILE ARG HIS ILE ASP GLU TYR ALA ASP HIS CYS ALA ASN THR TYR ASN ARG GLY LEU ASN ASN LEU PRO LYS SER

901

THR TYR GLN ASP TRP ILE THR TYR ASN ARG LEU ARG ARG ASP LEU THR VAL LEU ASP ILE ALA ALA PHE PHE PRO ASN TYR ASP

331

ASN ARG ARG TYR PRO ILE GLN PRO VAL GLY GLN LEU THR ARG GLU VAL TYR THR ASP PRO LEU ILE ASN PHE ASN PRO GLN LEU GLN SER  
1061 VAL ALA GLN LEU PRO THR PHE ASN VAL MET GLU SER SER ALA ILE ARG ASN PRO HIS LEU PHE ASP ILE LEU ASN ASN LEU THR ILE PHE  
1171 ILE TYR TRP PHE SER VAL GLY ARG ASN PHE TYR TRP GLY GLY HIS ARG VAL ILE SER SER LEU ILE GLY GLY ASN ILE THR SER PRO  
1241 ILE TYR GLY ARG GLU ALA ASN GLN GLU PRO PRO ARG SER PHE THR PHE ASN GLY PRO VAL PHE ARG THR LEU SER ILE PRO THR LEU ARG  
1331 LEU LEU GLN PRO CYS GLN ARG HIS HIS PHE ASN LEU ARG GLY GLY VAL GLU PHE SER THR PRO THR ASN SER PHE THR TYR  
1441 ARG GLY ARG GLY THR VAL ASP SER LEU THR GLU LEU PRO PRO GLU ASP ASN SER VAL PRO PRO ARG GLU GLY TYR SER HIS ARG LEU CYS  
1521 HIS ALA THR PHE VAL GLN ARG SER GLY THR PRO PHE LEU THR THR GLY VAL PHE SER TRP THR HIS ARG SER ALA THR LEU THR ASN  
1621 THR ILE ASP PRO GLU ARG ILE ASN GLN ILE PRO LEU VAL LYS GLY PHE ARG VAL TRP GLY THR SER VAL ILE THR GLY PRO GLY PHE  
1711 THR GLY GLY ASP ILE LEU ARG ARG ASN THR PHE GLY ASP PHE VAL SER LEU GLN VAL ASN ILE ASN SER PRO ILE THR GLN ARG TYR ARG  
1801 LEU ARG PHE ARG TYR ALA SER SER ARG ASP ALA ARG VAL ILE VAL LEU THR GLY ALA ALA SER THR GLY VAL GLY GLN VAL SER VAL

1134 PRO LEU GLN LYS THR MET GLU ILE GLY, GLU ASN LEU THR SER ARG THR PHE ARG TYR TARN ASP PHE SER, ASN PRO PHE SER PHE  
 1201 PHE ALA ASN PRO ASP ILE ILE GLY ILE SER GLU GLN PRO LEU PHE GLY ALA GLY SER ILE SER SER GLY GLU LEU TYR ILE ASP LYS ILE  
 2071 GLU ILE ILE LEU ALA ASP ALA THR PHE GLU ALA, GLU SER ASP LEU GLU ARG ALA GLN LYS ALA VAL ASN ALA LEU PHE THR SER SER ASN  
 2101 GLN ILE GLY LEU LYS THR ASP VAL THR ASP TYR, HIS ILE ASP GLN VAL SER ASN LEU VAL ASP CYS LEU SER ASP GLU PHE CYS LEU ASP  
 2231 GLU LYS ARG GLU LEU SER GLU LYS VAL LYS HIS ALA LYS ARG LEU SER ASP, GLU ARG ASN LEU LEU GLN ASP PRO ASN PHE ARG GLY ILE  
 2341 ASN ARG GLN PRO ASP ARG GLY TRP ARG GLY SER THR ASP ILE THR ILE GLN GLY GLY ASP VAL PHE LYS GLU ASN TYR VAL THR LEU  
 2431 PRO GLY THR VAL ASP GLU CYS TYR PRO THR TYR LEU TYR GLN LYS ILE ASP GLU SER LYS LEU LYS ALA TYR THR ARG TYR GLU LEU ARG  
 2521 GLY TYR ILE GLU ASP SER GLN ASP LEU GLU ILE TYR LEU ILE ALA TYR ASN ALA LYS HIS GLU ILE VAL ASN VAL PRO GLY THR GLY SER  
 2611 LEU TRP PRO LEU SER ALA GLN SER PRO ILE GLY LYS CYS GLY GLU PRO ASN ARG CYS ALA PRO HIS LEU GLU TRP ASN PRO ASP LEU ASP  
 2701 CYS SER CYS

15/ Vecteur recombinant d'expression et de clonage comportant au moins une partie de la séquence nucléotidique telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14.

5 16/ Plasmide selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il s'agit de pHT671 tel que représenté sur la figure 4, ou de pHT71 comprenant un fragment d'ADN HindIII-PstI constitué uniquement d'ADN provenant de la souche aizawai 7-29.

10 17/ Souches bactériennes modifiées, caractérisées en ce qu'après transformation elles comportent une séquence de nucléotides selon l'une des revendications 1 à 14.

18/ Souche bactérienne selon la revendication 17, caractérisée en ce qu'elle comporte au moins un vecteur recombinant selon la revendication 15 ou 16,

19/ Polypeptide toxique vis-à-vis des larves de lépidoptères et de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé en ce qu'il est capable de former un complexe immunologique avec des anticorps dirigés contre des polypeptides à activité larvicide vis-à-vis de S.littoralis.

20/ Polypeptide selon la revendication 19, caractérisé en ce qu'il comprend la séquence (II) ou la séquence (IV) d'acides aminés définies dans la revendication 14.

21/ Procédé d'obtention d'une séquence nucléotidique codant pour au moins une partie de la région N-terminale d'un polypeptide toxique de manière spécifique vis-à-vis de larves de lépidoptères de la famille des Noctuelles, de préférence vis-à-vis de S.littoralis, caractérisé par les étapes suivantes :

- la réalisation d'une hybridation entre d'une part une séquence de nucléotides d'une souche de B.thuringiensis



active contre S.littoralis et d'autre part, une ou plusieurs séquences de nucléotides utilisées comme sondes provenant de la partie 5' d'un fragment de restriction d'un gène d'une  $\delta$ -endotoxine de B.thuringiensis cette  
5 partie codant pour la partie N-terminale d'un polypeptide toxique vis-à-vis des lépidoptères et provenant de la partie 3' de ce fragment codant pour la partie COOH du polypeptide,

- l'isolement du fragment,

10 - son clonage dans un vecteur, suivi de sa purification.

22/ Procédé selon la revendication 21, caractérisé en ce que les sondes d'hybridation utilisées sont obtenues à partir d'un gène d'une  $\delta$ -endotoxine provenant d'une souche aizawai 7-29 codant pour une protéine de  
15 130kDa active contre P.brassicae et inactive vis-à-vis de S.littoralis, ce gène ayant été cloné dans le plasmide recombinant pHTA2.

23/ Procédé selon la revendication 21 ou 22, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans  
20 l'étape de clonage est élaboré à partir d'au moins une séquence de nucléotides issue d'au moins un vecteur recombinant contenant une séquence de nucléotides d'au moins une souche de B.thuringiensis.

24/ Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape  
25 de clonage est élaboré à partir de plusieurs séquences de nucléotides issues de vecteurs recombinants contenant des séquences de nucléotides d'au moins 2 souches différentes de B.thuringiensis, possédant les mêmes cartes de restriction et contenant elles-mêmes tout ou partie des  
30 séquences de nucléotides capables de coder pour un polypeptide actif de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis.

25/ Procédé selon la revendication 23, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape  
35

57

de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-PstI provenant de la souche aizawai 7.29.

26/ Procédé selon la revendication 24, caractérisé en ce que le fragment recombiné au vecteur dans l'étape de clonage est élaboré à partir d'un fragment de restriction HindIII-HincII provenant de la souche entomocidus 6-01 et d'un fragment de restriction HincII-PstI provenant de la souche aizawai 7-29.

27/ Procédé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le fragment de restriction recombiné selon la revendication 25 est porté préférentiellement par un plasmide pHTA6 et les fragments de restriction recombinés selon la revendication 26, HindIII-HincII et HincII-PstI sont portés préférentiellement par les plasmides recombinants respectifs pHTE6 et pHTA6, lesdits plasmides pHTA6 et pHTE6 étant tels qu'isolés à l'aide d'une sonde constituée par un fragment PvuII de 2kb du plasmide pBT15-88 correspondant à la partie interne d'un gène du cristal chromosomique de la souche berliner 1715, à partir de clones transformants renfermant des séquences nucléotidiques issues de souches B.thuringiensis actives vis-à-vis de larves de lépidoptères inter-alia de S.littoralis.

28/ Composition larvicide à activité préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle renferme une quantité efficace de polypeptide tel que défini dans l'une quelconque des revendications 19 à 20 exprimé par les séquences nucléotidiques selon l'une des revendications 1 à 14, le vecteur selon la revendication 15, ou le plasmide selon la revendication 16, ou la souche bactérienne selon l'une quelconque des revendications 17 ou 18.

29/ Application des séquences de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 pour produire

un polypeptide toxique vis-à-vis de lépidoptères, de préférence S.littoralis, dans des microorganismes capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences tels que E.coli, B.subtilis, B.cereus ou B.thuringiensis.

30/ Application selon la revendication 29, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes vivant dans l'environnement ou en association avec les plantes, tels que Pseudomonas, Azospirillum ou Rhizobium et capables d'exprimer des vecteurs recombinants renfermant ces séquences.

31/ Application selon la revendication 29 ou 30, caractérisée en ce que les séquences de nucléotides sont introduites dans des microorganismes en association avec différents gènes de  $\delta$ -endotoxine.

32/ Application des séquences nucléotidiques selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 à la transformation des plantes sensibles à S.littoralis, caractérisée en ce qu'elle comprend le transfert et l'expression de ces séquences dans ces plantes.

33/ Cellules végétales dont le génome, après transformation par un procédé non essentiellement biologique, possède de façon stable une séquence de nucléotides capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14 et, cellules issues de leur division.

34/ Plantes ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, transformées par un procédé non essentiellement biologique, dont le génome possède de façon stable une séquence de nucléotides, telle que définie dans l'une quelconque des revendications 1 à 14, capable d'exprimer un polypeptide toxique vis-à-vis de S.littoralis et,

plantes issues de leur reproduction, de leur multiplication, ou de croisements hybrides.

35/ Plante ayant en particulier pour prédateur S.littoralis, possédant en plus de leurs caractères  
5 génotypiques et phénotypiques initiaux la propriété d'exprimer un polypeptide toxique de manière préférentielle vis-à-vis de S.littoralis, cette propriété résultant de l'insertion dans son génome par manipulation  
10 génétique d'une séquence de nucléotides capable d'exprimer ledit polypeptide.

36/ Graine capable de donner une plante selon la revendication 34 ou 35 ou issue d'une telle plante, caractérisée en ce qu'elle a intégré dans son génome, par  
15 manipulation génétique une séquence de nucléotides selon l'une quelconque des revendications 1 à 14.

20

25

30

35